

**Optimasi Amobilisasi Xilanase dari *Trichoderma viride*
pada Matriks Pasir Laut Ca-Alginat**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
dalam bidang Kimia**

**Oleh:
Revina Intan Nurellyna Putri
145090201111022**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN
ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Optimasi Amobilisasi Xilanase dari *Trichoderma viride* pada Matriks Pasir Laut Ca-Alginat

Oleh:

REVINA INTAN NURELLYNA PUTRI
145090201111022

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada
tanggal.....**04 JAN 2018**
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I

Drs. Sutrisno, M.Si
NIP. 196203181990021001

Pembimbing II

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS
NIP. 196304041989011001



Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D.
NIP. 197310202002121001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Revina Intan Nurellyna Putri

NIM : 145090201111022

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul:

Optimasi Amobilisasi Xilanase dari *Trichoderma viride*
pada Matriks Pasir Laut Ca-Alginat

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain. Selain nama-nama yang termaktub diisi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan maka saya bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

04 JAN 2018

Malang,.....

Yang menyatakan,



(Revina Intan Nurellyna Putri)

NIM. 145090201111022

Optimasi Amobilisasi Xilanase dari *Trichoderma viride* pada Matriks Pasir Laut Ca-Alginat

ABSTRAK

Xilanase merupakan enzim yang berfungsi sebagai katalis pada reaksi hidrolisis xilan menjadi gula pereduksi xilosa. Dilakukan amobilisasi xilanase agar xilanase lebih stabil dan dapat digunakan lebih dari sekali. Matriks yang digunakan yaitu Ca-Alginat dan pasir laut yang berasal dari pantai Tanjung Aan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum amobilisasi enzim xilanase. Kondisi optimum yang dicari adalah konsentrasi xilanase optimum dan konsentrasi alginat optimum. Hasil penelitian diperoleh konsentrasi xilanase optimum yaitu 3,5 mg/mL dengan aktivitas enzim sebesar 16,79 $\mu\text{g}/\text{mg}.\text{menit}$. Sedangkan konsentrasi alginat optimum yaitu 3 % dengan aktivitas enzim sebesar 14,25 $\mu\text{g}/\text{mg}.\text{menit}$. Identifikasi xilanase amobil dilakukan dengan menggunakan instrumen FT-IR diperoleh bilangan gelombang 3440,25 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan N-H dari enzim dan 876,38 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan Si-OH antara pasir laut dengan enzim.

Kata Kunci: Xilanase, *Trichoderma viride*, Amobilisasi, Pasir Laut, Ca-Alginat

Optimation Immobilization Xylanase from *Trichoderma viride* on Matrix Sea Sand Ca-Alginate

ABSTRACT

Xylanase is an enzyme that acts as a catalyst in the hydrolysis reaction of xylan to xylose reducing sugar. Performed immobilized xylanase to make xylanase more stable and usable more than one time.. The matrix used is Ca-Alginate and sea sand from Tanjung Aan beach. The aim of this research is to know the optimum condition of immobilization of xylanase enzyme The optimum conditions sought are optimum concentrations of xylanase and optimum concentration of alginate. The result showed that the optimum xylanase concentration was 3.5 mg / mL with enzyme activity 16,79 μg / mg.min. While the optimum alginate concentration of 3% with enzyme activity 14.25 μg / mg.menit. Implementation of immobilized xylanase by using FT-IR instrument obtained wave number 3440,25 cm^{-1} shows the existence of N-H bond of enzyme and wave number 876,38 cm^{-1} shows existence of Si-OH bond between sea sand and enzyme.

Kata Kunci: Xylanase, *Trichoderma viride*, Immobilization, Sea sand, Ca-Alginat

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur Penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Optimasi Amobilisasi Xilanase dari *Trichoderma viride* pada Matriks Pasir Laut Ca-Alginat**” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, di Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang.

Penulis menyadari bahwa selama pelaksanaan dan penyelesaian skripsi ini telah banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Drs. Sutrisno, M.Si selaku Dosen Pembimbing I, yang telah banyak memberikan saran dan bimbingan selama penyusunan proposal penelitian, pelaksanaan penelitian hingga penulisan.
2. Dr. Sasangka P., M.S selaku Dosen pembimbing II yang telah memberikan saran dan bimbingan dalam pelaksanaan penelitian hingga penyusunan skripsi.
3. Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D. selaku Ketua Jurusan kimia yang telah memberikan dukungan dalam proses penyelesaian skripsi.
4. Djuni Hariyanto dan Yuniartri Winarsih selaku orang tua penulis serta keluarga besar yang selalu mendoakan, memberi dukungan baik spiritual, materil, maupun motivasi kepada penulis.
5. Melinda Novitasari selaku rekan satu tim penelitian dan Bpk. Maryono selaku Laboran Biokimia atas semua dukungan semangat dan berbagi ilmu yang terkait penelitian ini.
6. Niksi Tri Yulianti, Alimah Azmi, Hannisa Triesani Mandiri, Pretty Septiana, Ningrum Arrochmah, Reiza Tri Suciani Putri S., Nuril Azizah, Shinta Kumala Dewi, Dinda Retno Ayu, Fani Aulia D., Rahma Yulia U., Febrian Lukman, Fhaiz Rose Ambari Solihin, Astrid Dwi N., Kushariyanto dan Tsany Afif selaku sahabat dan kerabat yang selalu memberikan dukungan dan motivasi kepada penulis sehingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan.
7. Teman-teman kimia angkatan 2014 dan kimia A 2014 yang memberikan dukungan kepada penulis.
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuannya hingga terselesaikan laporan ini.

Penulis menyadari dalam laporan ini masih banyak terdapat kekurangan. Untuk itu, penulis mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap semoga laporan ini dapat bermanfaat khususnya bagi Penulis dan pembaca pada umumnya. Amin.

Malang, Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	2
1.3. Batasan Masalah	2
1.4. Tujuan Penelitian	2
1.5. Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
1.1. Enzim	4
1.2. Xilan	4
1.3. Klobot Jagung	5
1.4. <i>Trichoderma viride</i>	5
1.5. Enzim Xilanase	6
1.6. Isolasi Enzim	7
1.7. Amobilisasi Enzim	7
1.8. Aktivitas Enzim	8
1.9. Pasir Laut	9
1.10. Ca-Alginat	9
1.11. Instrumen FT-IR	10
1.12. Hipotesis	11
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	12
3.2. Bahan dan Alat Penelitian	12
3.3. Tahapan Penelitian	12
3.4. Prosedur Kerja	13

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Produksi dan Isolasi Enzim Xilanase dari Trichoderma viride	21
4.2. Amobilisasi Enzim Xilanase	22
4.3. Identifikasi Menggunakan FT-IR	26

BAB V PENUTUP

5.1. Kesimpulan	28
5.2. Saran	28

DAFTAR PUSTAKA	29
-----------------------	----

LAMPIRAN	33
-----------------	----

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 : Struktur Molekul Xilan	5
Gambar 2.2 : Struktur Molekul Ca-Alginat	10
Gambar 2.3 : Skema Alat FT-IR	10
Gambar 4.1 : Grafik hubungan variasi konsentrasi xilanase terhadap massa protein teramobil	23
Gambar 4.2 : Grafik hubungan variasi konsentrasi xilanase terhadap aktivitas enzim amobil	24
Gambar 4.3 : Grafik hubungan variasi konsentrasi alginat terhadap massa enzim teramobil	25
Gambar 4.4 : Grafik hubungan variasi konsentrasi alginat terhadap aktivitas enzim amobil	26
Gambar 4.5 : Spektra Matriks dan Enzim Xilanase Amobil	26
Gambar D.1 : Kurva Baku Gula Pereduksi Xilosa	38
Gambar E.1 : Kurva Baku Kasein	39

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 : Komposisi Kimia Klobot Jagung	5
Tabel 2.2 : Kandungan Senyawa Kimia Pasir Laut	9
Tabel 4.1 : Analisa Bilangan Gelombang FT-IR	27
Tabel D.1 : Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum	37
Tabel D.2 : Kurva Baku Gula Pereduksi	37
Tabel E.1 : Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum	38
Tabel E.2 : Kurva Baku Kasein	39
Tabel F.1 : Aktivitas Enzim Xilanase Bebas	41
Tabel G.1 : Kadar Protein Xilanase Awal	41
Tabel H.1 : Aktivitas Enzim Xilanase Amobil (Xilanase Optimum)	43
Tabel H.2 : Aktivitas Enzim Xilanase Amobil (Alginat Optimum)	44
Tabel I.1 : Kadar Protein Xilanase Sisa (Xilanase Optimum)	45
Tabel I.2 : Kadar Protein Xilanase Sisa (Alginat Optimum)	46
Tabel J.1 : Data Aktivitas Enzim pada Variasi Konsentrasi Xilanase	46
Tabel J.2 : Tabel ANOVA Variasi Xilanase	46
Tabel J.3 : Data Aktivitas Enzim pada Variasi Konsentrasi Alginat	47
Tabel J.4 : Tabel ANOVA Variasi Alginat	47

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN A. Tahapan Penelitian	33
LAMPIRAN B. Preparasi Larutan	34
LAMPIRAN C. Perhitungan Preparasi Larutan	35
LAMPIRAN D. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Kurva Baku Gula Pereduksi	37
LAMPIRAN E. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Kurva Baku Kasein	38
LAMPIRAN F. Aktivitas Enzim Xilanase Bebas	39
LAMPIRAN G. Kadar Protein Awal	41
LAMPIRAN H. Aktivitas Enzim Xilanase yang Diamobilisasi pada Matriks Pasir Laut Ca-Alginat	42
LAMPIRAN I. Kadar Protein Sisa	44
LAMPIRAN J. Analisa Statistik	46

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim merupakan polimer biologi yang mengkatalisis reaksi kimia dan mengubah suatu substrat menjadi suatu produk tertentu. Setiap enzim memiliki fungsi spesifik yang mempercepat suatu reaksi melalui jalur tertentu dengan menurunkan energi aktivasi yang dibutuhkan [1]. Setiap enzim memiliki satu sisi aktif spesifik yang dapat berikatan terhadap satu atau dua substrat. Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah suhu, derajat keasaman (pH), konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, inhibitor dan aktivator [2].

Enzim xilanase merupakan enzim yang dapat mendegradasi polisakarida β -1-4-xilan menjadi xilosa, melalui proses pemecahan hemiselulosa yang merupakan komponen utama dari dinding sel tanaman. Xilanase banyak dimanfaatkan pada industri kertas dan bubur kertas, pengolahan pakan ternak, industri minuman dan yang terbaru adalah produksi biofuel dari agroresidu [3]. Xilanase dapat diproduksi dari spesies bakteri, *actinomycetes* dan fungi [1].

Amobilisasi enzim adalah suatu metoda untuk mengurung atau menempatkan enzim secara fisik pada suatu ruang tertentu dimana enzim masih memiliki aktivitas katalitik serta dapat dipergunakan secara kontinu dan berulang kali. Keuntungan teknik amobilisasi sel diantaranya adalah dapat dipakai pada sistem kontinu, dapat digunakan secara berulang pada sistem batch, dapat dimanfaatkan untuk ekskresi metabolit sekunder, dapat melindungi dari gangguan aliran turbulen serta dapat mencegah inaktivasi interfacial [4]. Enzim dapat diamobilisasi melalui metode adsorpsi dengan menggunakan material jenis mineral seperti zeolit, bentonit, dan pasir laut. Enzim dapat diamobilisasi melalui metode *entrapment* (penjebakan) agar dapat digunakan kembali dan mudah dipisahkan dengan produk yang telah terbentuk. Salah satu material yang dapat digunakan untuk mengamobilisasi enzim adalah kalsium alginat yang bersifat inert [5]. Alginat dapat digunakan sebagai matriks

amobilisasi karena sifatnya yang tidak beracun, mekanisme kestabilan dan porositasnya tinggi, memerlukan prosedur yang sederhana untuk amobilisasi, dan harganya murah untuk diaplikasikan dalam industri makanan atau farmasi [6].

Pada penelitian sebelumnya [7], ditentukan kondisi optimum amobilisasi xilanase dari *Trichoderma viride* menggunakan matriks Ca-alginat kitosan yang meliputi konsentrasi xilanase dan konsentrasi alginat optimum. Hasil penelitian menunjukkan kondisi optimum amobilisasi xilanase adalah pada konsentrasi xilanase 0,314 mg/mL dan konsentrasi alginat 3 % dengan jumlah xilanase teradsorpsi 0,849 mg dengan aktivitas enzim xilanase amobil sebesar 17,008 unit.

Pada penelitian ini akan ditentukan kondisi optimum amobilisasi xilanase dari *Trichoderma viride* menggunakan matriks pasir laut terlapis Ca-alginat yang meliputi konsentrasi Ca-alginat optimum, dan konsentrasi xilanase optimum.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang dituliskan didapatkan rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana kondisi optimum amobilisasi enzim xilanase pada matriks pasir laut Ca-alginat?

1.3. Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Enzim xilanase yang digunakan adalah ekstrak enzim kasar.
2. Uji kondisi optimum amobilisasi xilanase konsentrasi alginat (1,5; 2; 2,5; 3; 3,5) % dan konsentrasi enzim xilanase sebesar (2; 2,5; 3; 3,5; 4) mg/mL pada matriks pasir laut Ca-alginat pada temperatur ruang
3. Identifikasi gugus fungsi dari enzim xilanase amobil dengan menggunakan spektrofotometer IR

1.4. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui kondisi optimum amobilisasi xilanase pada matriks pasir laut Ca-alginat

1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat diketahui kondisi optimum amobilisasi xilanase pada matriks pasir laut Ca-alginat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim

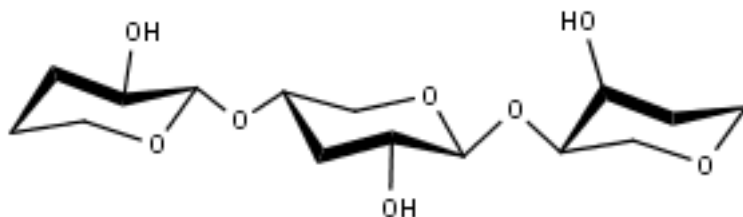
Enzim merupakan katalis biologi yang meningkatkan laju reaksi kimia. Reaktan pada reaksi enzimatik biasa disebut dengan substrat. Setiap enzim memiliki sifat spesifik terhadap satu atau beberapa substrat yang menghasilkan satu atau lebih produk. Semua enzim merupakan suatu protein, namun setiap enzim membutuhkan komponen atau senyawa non-protein yang disebut dengan cofaktor. Cofaktor dapat berbentuk sebagai molekul organik (coenzim) atau ion logam. Enzim dapat diklasifikasikan menjadi 6 jenis yaitu oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase dan ligase [8].

Enzim dapat diperoleh dengan cara ekstraksi dari tanaman, hewan, dan mikroorganisme. Keuntungan produksi enzim dari mikroba antara lain mudah dibiakkan, memiliki kecepatan tumbuh yang tinggi, dan mudah dikontrol pertumbuhannya [9]. Enzim digunakan sebagai katalis untuk reaksi biokimia pada suatu sel. Enzim dapat mempercepat laju reaksi hingga $10^8 - 10^{11}$ kali lebih cepat dibandingkan reaksi tanpa katalis [10]. Enzim dimanfaatkan pada berbagai bidang industri, produk pertanian, kimia, dan medis [11].

2.2. Xilan

Xilan merupakan komponen penting pada dinding sel tanaman yang mengandung hemiselulosa. Polimer xilan tersusun atas rantai D-xilosa dengan ikatan β -1,4 dan memiliki cabang antara lain L-arabinosa, D-glukosa, D-galaktosa, D-manosa, asam D-glukoronik, dan residu asam 4-O-metil glukoronik. Xilan merupakan substrat endo- β -1,4-D-xilanase untuk menghasilkan xilooligosakarida [12]. Xilan merupakan polimer dari pentosa yang jumlah monomernya berkisar 150-200 unit. Xilan dapat ditemukan pada limbah pertanian, antara lain pada dedak gandum (12,3%), bagas tebu (9,6%) dan sekam padi (12,1%) [13]. Xilan dapat dimanfaatkan pada bidang industri pembuatan nilon dan resin [14].

Berikut adalah struktur xilan [15]:



Gambar 2.1 : Struktur Molekul Xilan

2.3. Klobot Jagung

Jagung merupakan tanaman pokok untuk memenuhi kebutuhan energi setelah padi dan gandum. Hampir seluruh bagian jagung dapat dimanfaatkan. Bagian tongkol dan klobotnya biasa dimanfaatkan sebagai pakan ternak, sedangkan bagian bulir jagungnya dimanfaatkan sebagai tepung maizena dan minyak jagung [16].

Klobot jagung memiliki komposisi antara lain [17]:

Tabel 2.1 : Komposisi kimia klobot jagung

Komponen	Kandungan (%)
Serat kasar	38
Selulosa	6,41
Hemiselulosa	32
Abu	4,47
Protein kasar	6,41
Lignin	6,3

Hemiselulosa pada klobot jagung dapat dimanfaatkan sebagai sumber xilan untuk produksi enzim xilanase. Klobot jagung berfungsi sebagai sumber karbon dan induser pada pertumbuhan suatu mikroorganisme [17].

2.4. *Trichoderma viride*

Kapang *Trichoderma sp.* merupakan mikroorganisme saprofit yang dapat menyerang patogen sehingga menguntungkan bagi tanaman. Selain sebagai pengurai, spesies *Trichoderma sp.* dapat juga berfungsi sebagai agen hayati. Kelebihan *Trichoderma sp.* antara lain adalah mudah diisolasi, daya adaptasi luas, dapat tumbuh dengan cepat pada berbagai substrat, dan tidak bersifat patogen bagi tanaman. *Trichoderma sp.* yang umumnya

digunakan sebagai agen hayati adalah *T. harzianum*, *T. viridae*, *T. koningii* [18].

Trichoderma viride merupakan kapang berfilamen yang biasanya digunakan sebagai organisme penghasil enzim selulolitik [19]. Klasifikasi *Trichoderma viride* [20] :

Kingdom	: Fungi
Divisio	: Deuteromycota
Kelas	: Deuteromycetes
Subkelas	: Deuteromycetidae
Ordo	: Moniliales
Familia	: Moniliacea
Genus	: <i>Trichoderma</i>
Spesies	: <i>Trichoderma viride</i>

Trichoderma viride memiliki ukuran 2,8 -4,5 μm berbentuk tetap dan homogen, dengan cabang utama berukuran 4 – 5 μm [20]. Koloni pertama berwarna putih, dan koloni dewasa berwarna hijau tua atau hijau kebiru-biruan. Ada pula koloni yang berwarna kekuning-kuningan bergantung pada galurnya [21]. Selain menghasilkan enzim selulolitik untuk memecah selulosa, *Trichoderma viride* juga menghasilkan enzim xyloglukanolitik [19].

2.5. Enzim Xilanase

Xilanase merupakan enzim yang berperan dalam hidrolisis xilan (hemiselulosa) menjadi xilo-oligosakarida dan xilosa. Enzim xilanase dapat dihasilkan oleh berbagai jenis bakteri, khamir, kapang, protozoa, serangga dan siput [22].

Enzim xilanase yang berasal dari mikroba telah diklasifikasikan ke dalam dua famili utama berdasarkan karakteristik fisiko-kimianya (titik isoelektrik dan massa molekul relatif). Kelompok endoxilanase dengan nilai *pI* yang lebih rendah namun memiliki berat molekul relatif tinggi diklasifikasikan ke dalam famili GH10 atau famili F, sedangkan kelompok endoxilanase dengan nilai *pI* yang lebih tinggi namun memiliki berat molekul relatif rendah disebut famili GH11 atau famili G. Kedua famili tersebut memiliki perbedaan sifat katalitik dimana famili GH10 akan menyerang ikatan glikosida disebelah percabangan dan

mengarah pada ujung nonpereduksi menggunakan dua residu xilopiranosil non-substitusi antara cabang-cabang. Sedangkan famili GH11 yang menggunakan tiga residu xilopiranosil non-substitusi [23].

Aplikasi enzim ini cukup luas, di antaranya digunakan pada industri *pulp* dalam proses *deinking* dan *bleaching* sebagai pengganti proses kimiawi, yaitu penggunaan klorin yang bersifat toksik. Pada industri makanan dan minuman, xilanase digunakan untuk meningkatkan daya kembang roti, meningkatkan tekstur dan keseragaman wafer, menghasilkan gula rendah kalori untuk membantu diet penderita diabetes mellitus, dan sebagai bahan penjernih dalam industri minuman/jus buah. Pada industri farmasi, xilanase digunakan sebagai salah satu jenis enzim pada formula sediaan suplemen untuk mengatasi masalah pencernaan dan menghambat terjadinya osteoporosis, serta sebagai bahan tambahan pada formula pasta gigi. Xilanase juga dapat digunakan pada industri pakan ternak, bersama-sama dengan enzim-enzim lainnya seperti glukonase, pektinase, selulase, lipase dan lain-lain serta berpotensi membantu dalam pra-perlakuan biomassa pada industri bioenergi [22].

2.6. Isolasi Enzim

Enzim yang berasal dari mikroorganisme dapat dibagi menjadi dua yaitu enzim intraseluler dan enzim ekstraseluler. Enzim intraseluler dapat diisolasi dengan menghilangkan gangguan dari komponen biologi sel. Hal tersebut dapat dilakukan dengan metode mekanik seperti tekanan tinggi dan grinding, dan metode non mekanik seperti freeze drying dan lisis secara fisik, kimia dan enzimatik. Setelah itu dilakukan pemisahan dengan sel yang telah rusak dengan cara filtrasi atau sentrifugasi. Pemisahan tersebut harus dilakukan dengan kondisi pH, temperatur dan kekuatan ionik yang spesifik [24].

2.7. Amobilisasi Enzim

Amobilisasi enzim adalah penempelan enzim bebas atau terlarut pada suatu media yang berbeda untuk mengurangi atau menghilangkan mobilitas enzim. Enzim

yang teramobilisasi memiliki kelebihan antara lain kestabilan termal yang baik, sensitifitas yang tinggi terhadap agen denaturasi, dan pemisahan dan penggunaan kembali sebagai katalis dalam suatu reaksi lebih mudah [25]. Amobilisasi enzim dapat dilakukan dengan metode fisika dan metode kimia [26]. Amobilisasi enzim dapat dilakukan dengan beberapa metode antara lain entrapment atau penjebakan, pengikatan dengan media padat, dan ikatan silang [27].

Metode adsorpsi menggunakan matriks padat sebagai media agar enzim teramobilisasi tanpa mempengaruhi sisi aktif enzim akibat adanya gaya Van der Waals atau gaya dispersi yang lemah. Interaksi akan terjadi antara enzim dengan permukaan matriks pada campuran larutan enzim dengan padatan matriks. Kelebihan metode adsorpsi antara lain tidak membutuhkan reagen, membutuhkan tahapan aktivasi yang minim. Kekurangan dari metode ini antara lain dapat terjadi desorpsi protein dan adsorpsi non spesifik pada protein atau substansi lain [26].

Metode penjebakan didasarkan pada penahanan enzim pada suatu membran yang diletakkan diatas permukaan elektroda. Pori dari membran tersebut memungkinkan terjadinya difusi dari substrat sehingga dapat terbentuk produk. Kekurangan dari metode ini adalah terjadinya transfer massa dari substrat; produk; dan inhibitor, dan dapat terjadi pertumbuhan mikroorganisme pada permukaan membran [26].

Metode amobilisasi melalui ikatan kovalen didasarkan pada ikatan kovalen antara enzim dengan matriks. Kekurangan metode ini adalah metode ini harus dilakukan pada kondisi tertentu agar sisi aktif dari enzim tidak ikut berikatan dengan matriks dan tidak terpengaruh oleh reagen yang digunakan [26].

2.8. Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim dinyatakan dalam satuan internasional unit (IU) yang merupakan nilai perubahan 1 μg per menit tiap 1 mL larutan enzim. Unit SI untuk aktivitas enzim adalah 1 katal yang berarti 1 mol substrat berubah menjadi produk dalam satu detik [28]. 1 katal setara dengan

6×10^7 IU [29]. Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim antara lain temperatur, pH, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, aktivator dan inhibitor [30]. Enzim xilanase memiliki nilai aktivitas di tanah sebesar $1,33 - 3125 \mu\text{mol glukosa g}^{-1} 24 \text{ jam}^{-1}$ [31].

2.9. Pasir Laut

Pasir laut merupakan pasir yang berasal dari pelapukan batuan yang banyak mengandung feldspar dan kuarsa. Nilai kekerasan pasir laut adalah 7 (skala mohs), dengan berat jenis sebesar $2,65 \text{ kg/m}^3$, titik lebur 1715°C dan memiliki struktur kristal berupa heksagonal. Kandungan senyawa kimia dari pasir laut dapat dilihat pada tabel [32]:

Tabel 2.2 : Kandungan senyawa kimia pasir laut

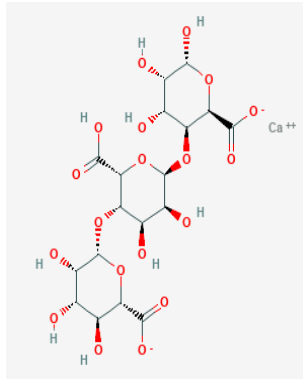
Senyawa Kimia	Komposisi (%)
SiO ₂	70 – 75
Fe ₂ O ₃	0,31
Al ₂ O ₃	0,01 – 0,18
CaO	0,01 – 0,49
MgO	0,01 – 0,26
K ₂ O	0,01 – 17

Kandungan SiO₂ yang tinggi akan menyebabkan pasir laut memiliki kemampuan adsorpsi yang tinggi. Pasir laut perlu diaktivasi untuk memperbesar pori atau memperbesar luas permukaan supaya daya adsorpsinya meningkat. Aktivasi dapat dilakukan secara kimia melalui penambahan asam [33].

2.10. Ca-Alginat

Alginat merupakan polisakarida alami yang banyak digunakan pada industri dan pengobatan, seperti amobilisasi atau isolasi senyawa kimia dan biologi pada sistem penjemakan sel. Alginat dapat diproduksi dari alga laut coklat seperti *Macrocystis*, *Laminaria*, *Aschophyllum*, *Fucus*, *Eklonia*, dan *Pelvetia*. Karakteristik dan sifat gel dari alginat sebagai media amobilisasi bergantung pada sumber alga dan adanya kation seperti timbal, tembaga, cadmium, barium, stronsium, kalsium, dan zinc [34]. Kelebihan dari Ca-alginat sebagai matriks antara lain dapat membentuk gel yang kokoh, tidak beracun, dapat digunakan pada temperatur

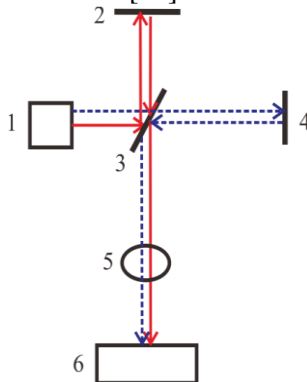
ruang dan ekonomis [35]. Struktur Ca-alginat adalah sebagai berikut [36]



Gambar 2.2 Struktur molekul Ca-alginat

2.11. Instrumen FT-IR

FTIR merupakan spektroskopi yang didasarkan pada interaksi antara radiasi IR dengan sampel, baik padat, cair ataupun gas. Spektroskopi ini mengukur intensitas absorpsi cahaya IR dari suatu sampel. Radiasi IR berada pada panjang gelombang 10^4 nm. Suatu gugus fungsi akan menghasilkan absorpsi cahaya IR yang spesifik sehingga spektroskopi ini dapat digunakan untuk identifikasi suatu senyawa kimia. Berikut adalah skema FTIR [37]:



Gambar 2.3 Skema Alat FTIR

Keterangan :

1. Sumber IR
2. Kaca Pemantul
3. Pembagi berkas (beam splitter)
4. Kaca statis
5. Sampel
6. Detektor

2.12. Hipotesis

Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini adalah :

1. Bentuk enzim xilanase amobil lebih kokoh

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang pada bulan September hingga Desember 2017.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan Penelitian

Bahan Penelitian yang digunakan adalah kultur murni *Trichoderma viride* yang diperoleh di Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya, dan klobot jagung. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah bahan yang memiliki derajat kemurnian pro analisa (p.a.) antara lain dekstrosa, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$, KH_2PO_4 , CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, xilosa, HCl, padatan BaCl_2 , DNS (asam dinitrosalisilat), padatan NaOH, kristal fenol, KMnO_4 , Na-alginat dan Na_2SO_3 . Bahan-bahan *for microbiology* antara lain kentang, pepton, asam oleat, kasein (Merck), tepung agar, xilan, tepung klobot jagung, dan akuades.

3.2.2. Alat Penelitian

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain gelas kimia (500 mL, 250 mL, 100 mL), Erlenmeyer (250 mL, 50 mL), pipet ukur (10 mL, 1 mL), pipet tetes, labu ukur (100 mL, 50 mL, 25 mL, 10 mL), tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas arloji, pengaduk gelas, corong gelas, botol semprot, botol sampel, inkubator (Heraus tipe B 50 Memmert), autoklav (*All American Model 20X*), jarum ose, mortar, cawan porselen, tanur (Nabertherm), sentrifuse dingin (*Tomy MX-305*), shaker (Edmund Buhler SM 25 24B), *magnetic stirrer*, pH meter (*Senz pH tester*), oven (Mettler), neraca analitik (Mettler 458 Todelo AL 204), lemari pendingin, *spectronic genesys 20*, kuvet, aluminium foil, kertas *Whatman* no. 40, kapas steril, pH universal, corong vakum buchner, pemanas listrik (*Janke-Kunkel*), dan ayakan 120 dan 150 mesh.

3.3. Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian ini adalah :

1. Pembuatan tepung klobot jagung

2. Pembuatan media padat
3. Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride*
4. Pembuatan media cair
5. Pembuatan inokulum
6. Produksi dan isolasi ekstrak kasar xilanase dari biakan *Trichoderma viride*
7. Penentuan aktivitas xilanase bebas
 - a. Penentuan panjang gelombang maksimum gula pereduksi xilosa
 - b. Pembuatan kurva baku gula pereduksi xilosa
 - c. Pengujian aktivitas xilanase bebas
 - d. Pengukuran aktivitas xilanase bebas
8. Penentuan kadar protein awal
 - a. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan kasein
 - b. Pembuatan kurva baku larutan kasein
 - c. Uji kadar protein awal
9. Amobilisasi enzim xilanase pada matriks Ca-alginat pasir laut teraktivasi
 - a. Preparasi matriks pasir laut
 - b. Aktivasi pasir laut
 - c. Preparasi larutan Na-alginat
 - d. Amobilisasi xilanase pada matriks Ca-alginat pasir laut teraktivasi
10. Penentuan kadar protein enzim xilanase sisa
11. Uji aktivitas enzim xilanase amobil
 - a. Penentuan aktivitas xilanase amobil
 - b. Pengukuran aktivitas xilanase amobil
12. Identifikasi menggunakan instrumen FTIR
13. Analisis Data

3.4. Prosedur Kerja

3.4.1. Pembuatan Tepung Klobot Jagung

Klobot jagung dicuci menggunakan akuades, lalu dikeringkan dalam oven pada temperatur 100°C. Setelah kering, klobot jagung dipotong dan dihaluskan menggunakan blender. Klobot jagung yang telah halus diayak menggunakan ayakan berukuran 150 mesh. Serbuk halus yang lolos ayakan disimpan dan digunakan sebagai induser.

3.4.2. Pembuatan Media Padat

Media padat yang digunakan adalah Potatoes Dextrose Agar (PDA). Dibuat menggunakan cara: 20 g kentang yang telah dikupas, dicuci menggunakan akuades dan di potong kecil-kecil. Kemudian dimasukkan dalam gelas kimia 100 mL, ditambahkan akuades hingga 100 mL, dipanaskan hingga mendidih selama 1 jam di atas pemanas listrik dan dijaga volume tetap 100 mL. Setelah itu disaring menggunakan kertas saring dan didapatkan sari kentang. Kemudian ke dalam sari kentang ditambahkan Dextrose sebanyak 2 g, 1 mL buffer asetat (0,2 M) pH 5, kemudian dipanaskan kembali hingga mendidih dan ditambahkan 1,5 g tepung agar sambil diaduk. Larutan PDA diambil sebanyak 4 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditutup dengan kapas dan dilapisi dengan kertas coklat. Kemudian disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121°C dan tekanan 15 psi. Larutan PDA steril dikeluarkan dari autoklaf, didinginkan pada temperatur ruang dengan posisi miring dan dibiarkan selama 24 jam. Media PDA yang telah padat disimpan di dalam *refrigerator*.

3.4.3. Peremajaan Biakan Murni *Trichoderma viride*

Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride* dilakukan di dalam *laminar air flow*. Jarum ose disiapkan, kemudian mulut tabung biakan murni *Trichoderma viride* dan mulut tabung media dipanaskan pada nyala api Bunsen supaya steril. Kemudian spora *Trichoderma viride* diambil sebanyak satu mata ose, dipindahkan ke dalam media padat steril secara aseptis. Setelah itu, tabung ditutup kembali dengan kapas steril, kemudian disimpan dan diinkubasi selama 6 hari (144 jam) dalam inkubator dengan temperatur 30°C.

3.4.4. Pembuatan Media Cair

Sejumlah 0,036 g KH_2PO_4 ; 0,054 g CaCl_2 ; 0,252 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,054 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,054 g urea; 0,005 g tween-80; 0,18 mL unsur renik dan 0,9 g klobot jagung ditimbang dengan neraca analitik. Kemudian dimasukkan semua bahan ke dalam erlenmeyer 250 mL, ditambahkan akuades sampai volume 180 mL, ditambahkan 1 mL buffer asetat (0,2M) pH 5. Campuran tersebut diaduk dan dipanaskan hingga mendidih. Kemudian ditutup kapas, dilapisi kertas coklat dan diikat

dengan karet. Selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121°C dan tekanan 15 psi.

3.4.5. Pembuatan Inokulum

Pembuatan inokulum dilakukan dalam *laminar air flow*. Spora hasil pembiakan murni *Trichoderma viride* yang telah berumur 6 hari diambil dengan jarum ose sebanyak satu mata ose dan dipindahkan secara aseptis ke dalam erlenmeyer 50 mL yang telah berisi 25 mL media cair steril. Kemudian diinkubasi menggunakan *shaker* selama 36 jam (pertengahan fase logaritma) dengan kecepatan 100 rpm pada temperatur ruang. Kemudian larutan inokulum 1 yang telah diinkubasi diambil sebanyak 5 mL dan dimasukkan ke dalam 4 erlenmeyer yang berisi media cair steril sebanyak 50 mL secara aseptis. Kemudian diinkubasi kembali menggunakan *shaker* selama 36 jam (pertengahan fase logaritma) dengan kecepatan 100 rpm pada temperatur ruang.

3.4.6. Produksi dan Isolasi Ekstrak Kasar Enzim Xilanase dari Biakan *Trichoderma viride*

Larutan inokulum sebanyak 18 mL dimasukkan ke dalam 6 erlenmeyer yang berisi media cair steril sebanyak 180 mL secara aseptis dalam *laminar air flow*. Campuran diinkubasi selama 60 jam pada temperatur kamar dan dikocok menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Setelah itu, ditambahkan 16 mL buffer asetat pH 5 dan disentrifugasi dingin dengan kecepatan 3000 rpm dan suhu 4°C selama 30 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar enzim xilanase.

3.4.7. Penentuan Aktivitas Xilanase Bebas

3.4.7.1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Gula Pereduksi Xilosa

Larutan xilosa 300 µg/mL dipipet 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 1 mL buffer asetat 0,2 M pH 5 dan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan pada penangas air selama 15 menit. Kemudian didinginkan pada air mengalir dan diencerkan menggunakan labu ukur 25 mL dengan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Digunakan akuades untuk blanko dengan perlakuan yang sama seperti sampel. Diukur absorbansi pada rentang

panjang gelombang 480-530 nm. Ditentukan panjang gelombang maksimum dengan cara memilih nilai absorbansi paling besar.

3.4.7.2. Pembuatan Kurva Baku Gula Pereduksi Xilosa

Xilosa ditimbang sebanyak 0,15 g, kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL dan dilarutkan dengan akuades secukupnya. Kemudian larutan dimasukkan ke labu ukur 100 mL dan ditambah akuades hingga tanda batas dan dikocok secukupnya. Diperoleh larutan stok gula 1500 µg/mL. Dipipet larutan sebanyak 2; 2,7; 3; 3,3; 3,7; 4; 4,3; dan 5 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambah akuades hingga tanda batas lalu dikocok hingga homogen. Diperoleh larutan stok 300, 400, 450, 500, 550, 600, 650, dan 750 µg/mL. Dipipet 1 mL dari setiap larutan kemudian ditambahkan 1 mL buffer asetat 0,2 M pH 5 dan reagen DNS 2 mL. Kemudian dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit dan diencerkan menggunakan labu ukur 25 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas dan dihomogenkan. Diukur absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimum. Dibuat kurva baku antara konsentrasi gula (µg/mL) pada sumbu x dan absorbansi pada sumbu y.

3.4.7.3. Pengujian Aktivitas Xilanase Bebas

Dimasukkan masing-masing 1 mL substrat xilan 1% (b/v) ke dalam tabung reaksi, dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit pada temperatur 60°C. Kemudian ditambahkan 1 mL ekstrak kasar enzim xilanase, 1 mL buffer asetat (0,2 M) pH 5 dan 1 mL air bebas reduktor, kemudian diinkubasi pada penangas air selama 55 menit pada temperatur 60°C. Kemudian ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan kembali pada penangas air selama 5 menit. Kemudian didinginkan dengan air mengalir, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambahkan akuades hingga tanda batas dan dihomogenkan. Diukur absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimum 490 nm dengan Spectronic Genesys 20.

3.4.7.4. Pengukuran Aktivitas Xilanase Bebas

Pada enzim bebas, 1 unit aktivitas merupakan 1 µg xilosa yang dihasilkan dari xilan tiap menit oleh setiap mL

enzim. Pengukuran aktivitas xilanase bebas dilakukan dengan cara memplotkan nilai absorbansi yang diperoleh pada persamaan kurva baku, sehingga diperoleh konsentrasi gula pereduksi dari hasil hidrolisis xilan oleh xilanase. Berikut persamaan untuk mengetahui satu unit aktivitas enzim:

$$AE = \frac{X \times V \times fp}{p \times q}$$

Keterangan: AE = aktivitas enzim ($\mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$)

X = konsentrasi gula pereduksi ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

V = volume total sampel (mL)

fp = faktor pengenceran

p = volume ekstrak xilanase (mL)

q = waktu reaksi (menit)

3.4.8. Penentuan Kadar Protein Awal

3.4.8.1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Kasein

Larutan kasein dengan konsentrasi 5000 $\mu\text{g/mL}$ sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan reagen Biuret sebanyak 8 mL dan larutan buffer asetat (0,2 M) pH 5 sebanyak 2 mL. Kemudian dikocok hingga homogen dan diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit. Diukur absorbansi pada rentang panjang gelombang 460-600 nm menggunakan Spectronic Genesys 20.

3.4.8.2. Pembuatan Kurva Baku Larutan Kasein

Kasein ditimbang sebanyak 1 g, dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL, kemudian diaduk menggunakan pengaduk magnetik dan ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 0,1 N hingga kasein larut sempurna. Kemudian larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen. Diperoleh larutan stok kasein 10000 $\mu\text{g/mL}$. Dipipet larutan stok dengan volume (1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; dan 9) mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan akuades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen. Diperoleh larutan kasein (1000, 2000, 3000, 4000, 5000,

6000, 7000, 8000, dan 9000) $\mu\text{g/mL}$. Dipipet sebanyak 2 mL masing-masing konsentrasi larutan kasein, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan sebanyak 2 mL larutan buffer asetat (0,2 M) pH 5 dan 8 mL reagen Biuret. Kemudian dikocok hingga homogen dan diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit. Diukur absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimum. Dibuat kurva baku hubungan antara konsentrasi kasein ($\mu\text{g/mL}$) pada sumbu x dengan absorbansi pada sumbu y.

3.4.8.3. Uji Kadar Protein Awal

Ekstrak xilanase dipipet sebanyak 2 mL ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian dikocok hingga homogen dan diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit. Diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum menggunakan Spectronic Genesys 20. Kadar protein awal diketahui dengan cara memplotkan nilai absorbansi pada persamaan kurva baku kasein.

3.4.9. Amobilisasi Enzim Xilanase pada Matriks Ca-Alginat

3.4.9.1. Preparasi matriks pasir laut

Pasir laut ditumbuk halus, kemudian diayak menggunakan ayakan 120 mesh. Kemudian pasir yang lolos ayakan 120 mesh diayak kembali menggunakan 150 mesh. Pasir yang tertahan pada ayakan 150 mesh digunakan sebagai matriks amobilisasi. Selanjutnya pasir dihomogenkan, dicuci menggunakan akuades, disaring dan dikeringkan dalam oven pada temperatur 105°C .

3.4.9.2. Aktivasi matriks pasir laut

Pasir laut hasil preparasi ditimbang sebanyak 10 gram, kemudian direndam di dalam 200 mL larutan HCl 0,4 M. Setelah itu, dikocok menggunakan *shaker* pada temperatur ruang selama 4 jam dengan kecepatan 100 rpm. Pasir laut hasil perendaman disaring menggunakan kertas saring *Whatman* no.40, kemudian dicuci menggunakan akuades hingga air pencuci netral. Pasir laut kemudian dikeringkan pada temperatur 105°C hingga berat konstan. Selanjutnya, pasir laut dikalsinasi pada temperatur 500°C selama 4 jam.

3.4.9.3. Preparasi Larutan Na-Alginat

Na-alginat sebanyak 0,3 g dilarutkan dengan 100 mL akuades didalam gelas kimia 250 mL. Kemudian dipanaskan didalam penangas air hingga larut sempurna, lalu didinginkan.

3.4.9.4. Amobilisasi Xilanase pada Matriks Ca-Alginat

Enzim murni dipipet sebanyak (1,6; 2; 2,4; 2,8; 3,2) mL, dimasukkan ke dalam gelas ukur 10 mL. Selanjutnya ditambahkan buffer asetat 0,2 M pH 5 hingga volume 5 mL. Larutan enzim murni dimasukkan ke dalam botol sampel yang telah berisi 0,1 g pasir laut teraktivasi. Kemudian dikocok menggunakan *shaker* selama 3 jam dengan kecepatan 100 rpm pada temperatur ruang. Setelah itu disaring menggunakan kertas saring Whatman no. 40. Endapan yang diperoleh kemudian dicampurkan dengan larutan alginat dengan konsentrasi 3 %. Kemudian campuran xilanase dan larutan alginat diteteskan dengan syringe 10 mL pada gelas kimia yang telah berisi larutan CaCl_2 7,5 mL. Kemudian manik-manik yang telah terbentuk dibiarkan terendam dalam larutan CaCl_2 0,15 M selama satu jam agar manik-manik menjadi keras. Kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman no. 40. Endapan yang diperoleh merupakan xilanase amobil yang selanjutnya ditentukan aktivitasnya. Kemudian digunakan konsentrasi xilanase optimum untuk menentukan konsentrasi alginat optimum.

3.4.10. Identifikasi Menggunakan Instrumen FT-IR

Enzim amobil diambil sebanyak 0,2 g, kemudian diidentifikasi menggunakan instrumen FT-IR. Pada instrumen FT-IR untuk mengetahui jenis gugus senyawa yang ada pada enzim amobil.

3.4.11. Penentuan Kadar Protein Enzim Xilanase Sisa

Kadar protein sisa ditentukan dengan cara 2 mL filtrat dari enzim amobil ditambah dengan 2 mL larutan kasein 5000 ppm dan 8 mL reagen Biuret, kemudian dikocok hingga homogen dan diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit. Setelah itu, didinginkan pada temperatur ruang kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum kasein,

sehingga kadar protein diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada kurva regresi standar kasein.

3.4.12. Uji Aktivitas Enzim Xilanase Amobil

3.4.12.1. Penentuan Aktivitas Xilanase Amobil

Dimasukkan masing-masing 1 mL substrat xilan 1% (b/v) ke dalam tabung reaksi, dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit pada temperatur 60°C. Kemudian ditambahkan 0,1 gram enzim xilanase amobil, 1 mL buffer asetat (0,2 M) pH 5 dan 1 mL air bebas reduktor, kemudian diinkubasi pada penangas air selama 55 menit pada temperatur 60°C. Kemudian ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan kembali pada penangas air selama 5 menit. Kemudian didinginkan dengan air mengalir, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambahkan akuades hingga tanda batas dan dihomogenkan. Di ukur absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimum dengan Spectronic Genesys 20.

3.4.12.2. Pengukuran Aktivitas Xilanase Amobil

Pada enzim amobil, 1 unit aktivitas merupakan 1 µg xilosa yang dihasilkan dari xilan tiap menit oleh setiap mL enzim. Pengukuran aktivitas xilanase amobil dilakukan dengan cara memplotkan nilai absorbansi yang diperoleh pada persamaan kurva baku, sehingga diperoleh konsentrasi gula pereduksi dari hasil hidrolisis xilan oleh xilanase. Berikut persamaan untuk mengetahui satu unit aktivitas enzim:

$$AE = \frac{X \times V \times fp}{p \times q}$$

Keterangan: AE = aktivitas enzim (µg.mL⁻¹.menit⁻¹)

X = konsentrasi gula pereduksi (µg.mL⁻¹)

V = volume total sampel (mL)

fp = faktor pengenceran

p = massa enzim amobil (mg)

q = waktu reaksi (menit)

3.4.13. Analisis Data

Data hasil aktivitas enzim xilanase amobil dianalisis dengan menggunakan uji ANOVA satu arah.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Produksi dan Isolasi Enzim Xilanase dari *Trichoderma viride*

Xilanase merupakan enzim yang berperan dalam hidrolisis xilan (hemiselulosa) menjadi xilo-oligosakarida dan xilosa. Enzim xilanase dapat dihasilkan oleh berbagai jenis bakteri, khamir, kapang, protozoa, serangga dan siput [22]. Produksi xilanase diawali dengan meremajakan biakan *Trichoderma viride* pada media padat untuk mendapatkan kapang yang baru.

Mikroba yang ditumbuhkan pada media cair dengan nutrisi terbatas akan mengalami beberapa fase, yaitu fase adaptasi, fase percepatan pertumbuhan, fase logaritmik, fase perlambatan pertumbuhan, dan fase stasioner [38]. Pada produksi enzim diperlukan biakan aktif (inokulum) supaya hasil yang diperoleh maksimal. Oleh karena itu *Trichoderma viride* yang telah diremajakan ditumbuhkan pada media cair hingga pertengahan fase logaritmik. Jumlah enzim yang dihasilkan saat produksi sebanding dengan jumlah mikroba, dimana semakin banyak mikroba maka semakin banyak pula enzim yang dihasilkan. Produksi xilanase dilakukan sampai akhir fase logaritmik, dimana pada fase ini *Trichoderma viride* ada dalam jumlah maksimal sehingga xilanase yang dihasilkan juga maksimal.

Xilanase yang berasal dari *Trichoderma viride* merupakan enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang dihasilkan diluar sel. Isolasi enzim xilanase dilakukan dengan menggunakan sentrifugasi dingin sehingga partikel dengan berat yang lebih besar akan terendapkan. Partikel yang mengendap merupakan komponen sisa dari *Trichoderma viride*, sedangkan supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim xilanase yang akan diamobilisasi. Ekstrak kasar enzim xilanase yang diperoleh sebanyak 1,5 L.

Setelah diperoleh ekstrak kasar enzim xilanase dilakukan pengukuran aktivitas enzim dan kadar protein dalam enzim. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan

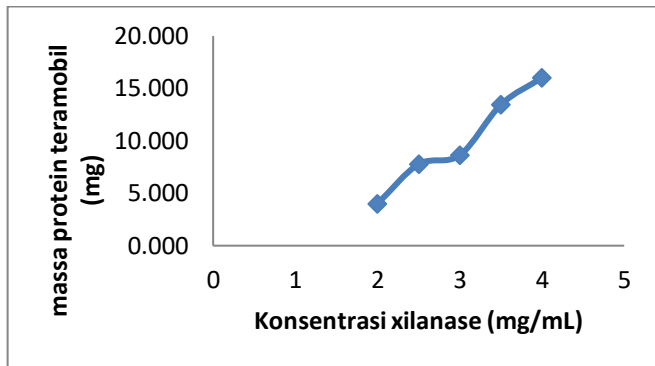
menggunakan reagen DNS dan diperoleh aktivitas enzim bebas sebesar 13,14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ menit. Sedangkan pengukuran kadar protein awal dilakukan dengan menggunakan reagen biuret dan diperoleh kadar protein awal sebesar 6,252 mg/mL .

4.2. Amobilisasi Enzim Xilanase

Amobilisasi dilakukan dengan menggunakan pasir laut Ca-alginat supaya enzim lebih stabil dan dapat digunakan berulang-ulang. Pada penelitian ini dilakukan variasi konsentrasi xilanase dan variasi konsentrasi alginat agar dapat diketahui kondisi optimum amobilisasi enzim xilanase sehingga dapat digunakan sebagai katalis dengan menghasilkan produk yang maksimal.

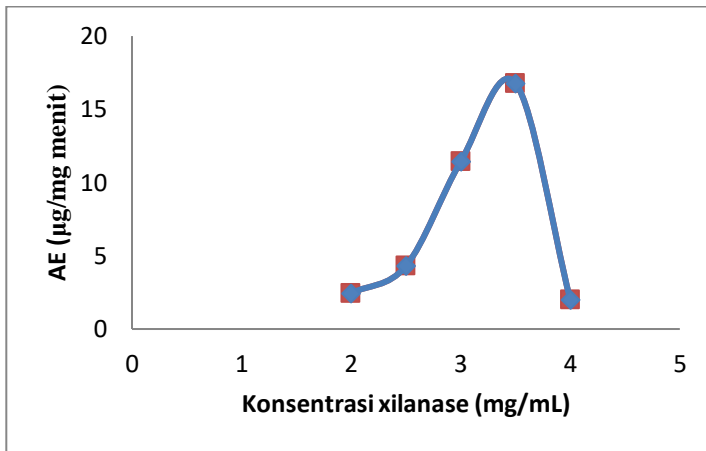
4.2.1. Penentuan Konsentrasi Xilanase Optimum

Pada penelitian ini digunakan enzim xilanase dengan konsentrasi (2; 2,5; 3; 3,5; 4) mg/mL yang diamobilisasi pada matriks pasir laut Ca-alginat sehingga diperoleh manik-manik yang kokoh. Manik-manik tersebut digunakan untuk mengukur aktivitas enzim xilanase amobil dengan menggunakan reagen DNS dan diperoleh aktivitas xilanase amobil optimum sebesar 16,79 $\mu\text{g}/\text{mg}$ menit pada konsentrasi xilanase 3,5 mg/mL atau pada volume pengambilan xilanase sebesar 2,8 mL . Sedangkan filtrat sisa digunakan untuk mengukur kadar protein sisa dengan menggunakan reagen biuret dan diperoleh kadar protein sisa sebesar 1,08 mg/mL . Dari pengukuran kadar protein sisa diperoleh hasil bahwa kadar protein meningkat sebanding dengan peningkatan konsentrasi xilanase. Kadar protein yang meningkat menunjukkan bahwa massa protein enzim yang teradsorpsi juga meningkat. Hal tersebut disebabkan karena semakin banyak jumlah protein enzim yang tersedia sehingga semakin banyak protein yang teradsorpsi di permukaan pasir laut.



Gambar 4.1. Grafik hubungan variasi konsentrasi xilanase terhadap massa protein teramobil

Aktivitas enzim xilanase pada variasi konsentrasi xilanase mengalami peningkatan yang disebabkan karena semakin banyak protein yang teradsorpsi maka semakin banyak sisi aktif enzim yang mampu untuk berikatan dengan substrat sehingga menghasilkan produk dengan jumlah tinggi. Jumlah produk yang tinggi akan mempengaruhi nilai aktivitas enzim, dimana semakin tinggi produk yang dihasilkan maka nilai aktivitas enzim juga akan semakin meningkat. Namun pada konsentrasi tertentu aktivitas enzim mengalami penurunan. Hal tersebut disebabkan oleh efek sterik yang timbul akibat protein enzim yang teradsorpsi terlalu banyak, sehingga sisi aktif dari enzim sulit untuk berikatan dengan substrat. Maka diperoleh nilai aktivitas enzim yang rendah atau mengalami penurunan. Dari uji ANOVA diperoleh F hitung sebesar 0,00001 dan 3,91; dimana F hitung lebih kecil daripada F tabel, baik 5% maupun 1%. Maka dapat disimpulkan bahwa antar perlakuan variasi konsentrasi xilanase tidak ada perbedaan yang nyata.

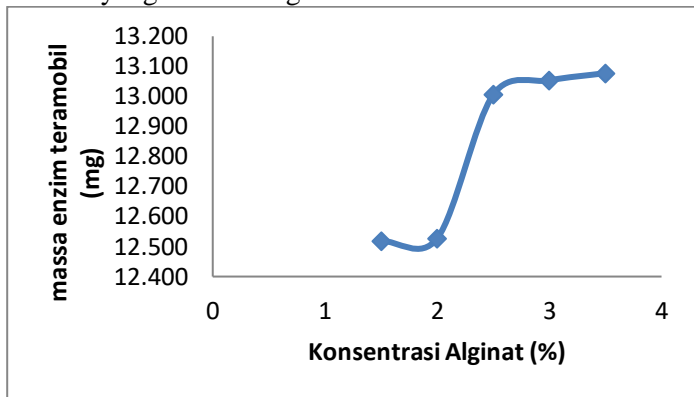


Gambar 4.2. Grafik hubungan variasi konsentrasi xilanase terhadap aktivitas enzim amobil

4.2.2. Penentuan Konsentrasi Alginat Optimum

Konsentrasi xilanase optimum selanjutnya digunakan untuk menentukan konsentrasi alginat optimum. Amobilisasi dilakukan dengan menggunakan konsentrasi xilanase 3,5 mg/mL yang diamobilkan pada variasi konsentrasi larutan alginat (1,5; 2; 2,5; 3; 3,5) sehingga diperoleh manik-manik yang kokoh. Manik-manik tersebut digunakan untuk mengukur aktivitas enzim xilanase amobil dengan menggunakan reagen DNS dan diperoleh aktivitas xilanase amobil optimum sebesar 14,25 µg/mg menit pada konsentrasi alginat 3 %. Sedangkan filtrat sisa digunakan untuk mengukur kadar protein sisa dengan menggunakan reagen biuret dan diperoleh kadar protein sisa sebesar 1,14 mg/mL. Dari pengukuran kadar protein sisa diperoleh hasil bahwa kadar protein meningkat sebanding dengan peningkatan konsentrasi alginat. Kadar protein yang meningkat menunjukkan bahwa massa protein enzim yang teradsorpsi juga meningkat. Hal tersebut disebabkan karena semakin tinggi konsentrasi alginat maka pori alginat yang terbentuk semakin kecil. Sehingga protein enzim yang telah teradsorpsi

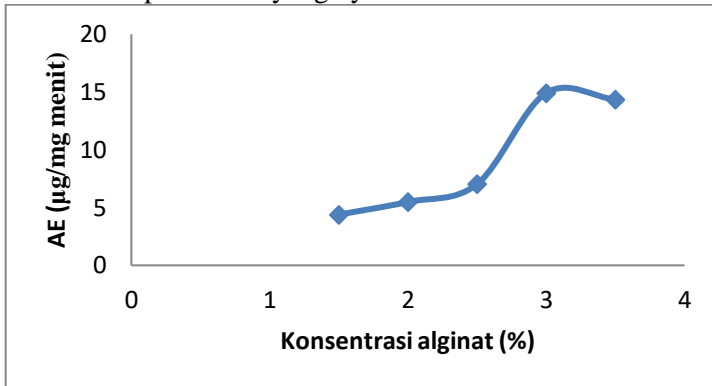
akan sulit lepas dari matriks dikarenakan protein enzim yang berukuran lebih besar daripada pori-pori yang dimiliki alginat.



Gambar 4.3. Grafik hubungan variasi konsentrasi alginat terhadap massa enzim teramobil

Aktivitas enzim xilanase pada variasi konsentrasi alginat mengalami peningkatan yang disebabkan karena semakin banyak protein yang teradsorpsi maka semakin banyak sisi aktif enzim yang mampu untuk berikatan dengan substrat sehingga menghasilkan produk dengan jumlah tinggi. Jumlah produk yang tinggi akan mempengaruhi nilai aktivitas enzim, dimana semakin tinggi produk yang dihasilkan maka nilai aktivitas enzim juga akan semakin meningkat. Namun pada konsentrasi tertentu aktivitas enzim mengalami penurunan. Hal tersebut disebabkan oleh efek sterik yang timbul akibat protein enzim yang teradsorpsi terlalu banyak, sehingga sisi aktif dari enzim sulit untuk berikatan dengan substrat. Selain itu juga disebabkan pori alginat yang menutupi permukaan pasir laut semakin kecil sehingga sisi aktif enzim sulit untuk berikatan dengan substrat. Maka diperoleh nilai aktivitas enzim yang rendah atau mengalami penurunan. Dari uji ANOVA diperoleh F hitung sebesar 0,016 dan 58,46; dimana terdapat F hitung lebih besar daripada F tabel, baik

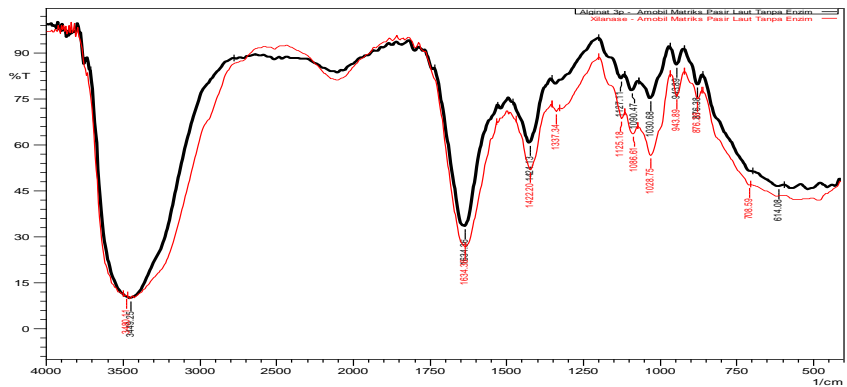
5% maupun 1%. Maka dapat disimpulkan bahwa antar perlakuan variasi konsentrasi alginat terdapat perbedaan yang nyata.



Gambar 4.4. Grafik hubungan variasi konsentrasi alginat terhadap aktivitas enzim amobil

4.3. Identifikasi Menggunakan Instrumen FT-IR

Enzim xilanase amobil dilakukan identifikasi menggunakan instrumen FT-IR untuk mengetahui teradsorbsnya enzim pada matriks. Instrumen FT-IR digunakan untuk mengetahui gugus fungsi penyusun dari senyawa yang ingin diketahui komponennya.



Gambar 4.5. Spektra Matriks dan Enzim Xilanase Teramobil

Tabel 4.1. Analisa Bilangan Gelombang FT-IR

No.	Rentang Bil. Gelombang (cm^{-1})	Matriks		Enzim teramobil	
		Bil. Gelombang (cm^{-1})	Ikatan	Bil. Gelombang (cm^{-1})	Ikatan
1.	675-995	708,59	C-H alkena	710,35	C-H alkena
2.	830-1000	876,38	Si-O	876,38	Si-OH
3.	1000-1110	1028,75	Si-OC	1030,68	Si-OC
4.	1340-1470	1422,20	C-N	1424,13	C-N
5.	1500-1705	1634,36	C-O-C C=O	1634,36	C-O-C C=O
6.	3200-3600	3480,11	-OH	3449,25	N-H -OH

Hasil Identifikasi menggunakan instrumen FT-IR diperoleh bilangan gelombang seperti tabel di atas. Pada spektra IR yang diperoleh terlihat adanya perbedaan yang nyata antara spektra matriks dengan enzim teramobil. Perbedaan tersebut ditunjukkan dengan adanya perbedaan intensitas tiap puncak. Perbedaan ada pada rentang bilangan gelombang 3200-3600. Dimana pada bilangan gelombang 3480,11 cm^{-1} di spektra matriks menunjukkan adanya gugus OH dari matriks Ca-Alginat, baik dari gugus hidroksil maupun karboksilat yang ditunjukkan dari serapan yang melebar. Sedangkan pada bilangan gelombang 3440,25 cm^{-1} di spektra enzim teramobil menunjukkan serapan yang overlap antara gugus N-H dan OH, dimana serapan N-H akan muncul pada bilangan gelombang sekitar 3300-3200 cm^{-1} , sehingga serapan yang terbentuk lebih runcing.

BAB V

PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan:

1. Konsentrasi xilanase optimum amobilisasi pada matriks pasir laut Ca-alginat adalah 3,5 $\mu\text{g/mL}$
2. Konsentrasi alginat optimum amobilisasi pada matriks pasir laut Ca-alginat adalah 3 %
3. Identifikasi enzim xilanase amobil dan matriks Ca-alginat pasir laut teraktivasi menggunakan FT-IR didapatkan perbedaan bilangan gelombang antara matriks tanpa enzim dan enzim xilanase amobil pada bilangan gelombang 3480,11 cm^{-1} di spektra matriks menunjukkan adanya gugus OH dari matriks Ca-Alginat, dan pada bilangan gelombang 3440,25 cm^{-1} di spektra enzim teramobil menunjukkan adanya gugus N-H dan OH yang overlap sehingga serapan yang terbentuk lebih runcing.

5.2. Saran

Untuk penelitian selanjutnya sebaiknya setiap akan melakukan pengukuran menggunakan reagen yang baru dibuat.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Abdalla, A., Manaf, A., Heyam, I., Emsalem, F., dan Azzam, A. 2014, **Production of Xylanase Enzyme from *Aspergillus Terreus* SUK-1**, International Journal of ChemTech Research, Vol. 6, No. 11, 4884-4889
- [2] Risnawan, M., dan Sari, E. C., 2013, **Pengaruh Penambahan Ion Logam Ca^{2+} Terhadap Aktivitas Enzim Papain**, UNESA Journal of Chemistry, Vol. 2, No. 1
- [3] Shahi, N., Adria, H., Salman, A., Haris, M. S., Usman, S., dan Kalim, M. A., 2016, **Xylanase: A Promising Enzyme**, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, Vol. 8, No. 3, 334-339
- [4] Saparianti, E., 2001, **Amobilisasi Sel *Pediococcus acidilactici* F11 Penghasil Bakteriosin Pada Gel Kalsium Alginat**, Jurnal Teknologi Pertanian, Vol. 2, No. 1, 1-9
- [5] Raghu, H. S., dan Rajeshwara, N. A., 2015, **Immobilization of α -Amylase (1, 4- α -D-Glucanglucanohydralase) by Calcium Alginate Encapsulation**, International Food Research Journal, Vol. 22, No. 2, 869-871
- [6] Kusumaningtias, N., Nies, S. M., dan Purbowatiningrum, R. S., 2016, **Kalsium Alginat Sebagai Pendukung Amobilisasi L-Asparaginase dari Bawang Putih (*Allium sativum*)**, Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia, Vol. 1, No. 2, 7-15
- [7] Mesla, W., Chanif, M., dan Sutrisno, 2014, **Optimasi Amobilisasi Xilanase dari *Trichoderma viride* Menggunakan Matriks Ca-Alginat-Kitosan**, Kimia Student Journal, Vol. 2, No. 1, 428-434
- [8] Palmer, T., dan Philip, L. B., 2007, **Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry**, Woodhead Publishing, UK
- [9] Montesqrit, 2007, **Isolasi dan Karakteristik Selulase dari *Trichoderma viride* dan *Rhizopus Spp* dengan Substrat Jerami Padi**, Jurnal Peternakan Indonesia, Vol. 12, No. 2, 112-123
- [10] Wahyu, S. M., Siti, D. K., Tanti, D. L., dan Petrissia, E. M., 2011, **Produksi, Karakterisasi, dan Isolasi Lipase dari**

Aspergillus niger, Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan”

- [11] Fitriani, Hasnah, N., dan Damma, S., 2014, **Eksplorasi Mikroba Penghasil Enzim Protease dari Sumber Air Panas Lejja Kabupaten Soppeng Sulawesi Selatan**, Indonesia Chimica Acta
- [12] Ratnadewi, A. A. I., Wuryanti, H., Agung, B. S., dan Siti N. A., 2016, **Optimasi Konsentrasi Substrat Xilan Ampas Tahu dengan Endo- β -1,4-D-Xylanase untuk Memproduksi Xilooligosakarida**, Journal Kimia Riset, Vol. 1, No. 2, 73-80
- [13] Santi, O., Istri, R., Wuryanti, H., dan Agung, B. S., 2015, **Isolasi Xilan dari Kulit Singkong dan Uji Reaktivitasnya Terhadap Enzim Endo- β -1,4 Xylanase**, Prosiding Seminar Nasional Kimia
- [14] Richana, N., Tun, T. I., M. Anwar, N., Illah, S., Khaswar, S., dan Yandra, A., 2007, **Ekstraksi Xilan dari Tongkol Jagung**, Jurnal Pascapanen, Vol. 4, No. 1, 38-43
- [15] Motta, F. L., Andrade, C. C. P., dan Santana, M. H. A., 2012, **A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications**, InTech
- [16] Sotoro, Y., Sulaeman, dan Iskandar, 1988, **Budidaya Tanaman Jagung**, Pusat Penelitian dan Pengembangan Pangan, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Bogor
- [17] Mayasari, D., 2009, **Pengaruh Sumber Karbon Terhadap Produksi Enzim Xilanase dari *Trichoderma viride***, Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang
- [18] Gusnawaty, H. S., Muhammad, T., Leni, T., dan Asniah, 2014, **Karakterisasi Morfologis *Trichoderma spp.* Indigenus Sulawesi Tenggara**, Jurnal Agroteknos, Vol. 4, No. 2, 87-93
- [19] Gunam, I. B. W., Wayan, R., A., dan Surya, I. B., 2011, **Produksi Selulase Kasar dari Kapang *Trichoderma viride* dengan Perlakuan Konsentrasi Substrat Ampas Tebu dan Lama Fermentasi**, Jurnal Biologi, Vol. 15, No. 2, 29-33

- [20] Charney, W., dan Hershel, L. H., 1967, **Microbial Transformations of Steroids**, Academic Press, New York
- [21] Cikita, D., Siti, K., dan Riza, L., 2016, **Uji Antagonis *Trichoderma spp.* Terhadap *Phytophthora palmivora* Butl. Penyebab Penyakit Busuk Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*)**, Jurnal Protobiont, Vol. 5, No.3, 59-65
- [22] Fawzya, Y. N., Rani, E. P., Wibowo, M., Ifah, M., dan Gintung, P., 2013, **Produksi dan Karakterisasi Xilanase dari Isolat Bakteri M-123 Asal Air Laut Manado**, JPB Kelautan dan Perikanan, Vol. 8, No. 1, 55-64
- [23] Ratnadewi, I. A. A., Wuryanti, H., dan Ni Nyoman, T. P., 2007, **Produksi dan Karakterisasi Enzim β -Endoxilanase dari Bakteri Sistem Intestinal Rayap**, Jurnal Ilmu Dasar, Vol. 8, No. 2, 110-117
- [24] Aehle, W., 2007, **Enzymes in Industry: Production and Applications**, John Wiley & Sons, Weinheim
- [25] Ali, A. K., dan Mohammad, A. A., 2010, **Recent Advances and Applications of Immobilized Enzyme Technologies: A Review**, Research Journal of Biological Sciences, Vol. 5, No. 8, 565-575
- [26] Guisan, J. M., 2006, **Immobilization of Enzymes and Cells Second Edition**, Humana Press, New Jersey
- [27] Fernandes, P. 2010, **Enzymes in Food Processing: A Condensed Overview on Strategies for Better Biocatalysts**, Enzyme Research
- [28] Robert, R., H., 2002, **Resensi Ilmu Laboratorium Klinis**, EGC, Jakarta
- [29] Makfoeld, D., Djagal, W., Pudji, H., Sri, A., Sri, R., Sudarmanto, S., Suhardi, Soeharsono, M., Suwedo, H., dan Tranggono, 2002, **Kamus Istilah Pangan dan Nutrisi**, Kanisius, Yogyakarta
- [30] Aryadi, F., 2014, **Peningkatan Stabilitas Enzim Selulase dari *Bacillus Subtilis* ITBCCB148 dengan Modifikasi Kimia Menggunakan Sianurat Klorida Polietilenglikol (CC-PEG)**. *Skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung, Lampung

- [31] Richard, G., B., dan Richard, P., D., 2002, **Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications**, Marcel Dekker Inc., New York
- [32] Direktorat Gizi Depkes R.I., 1981, **Dalam: Daftar Komposisi Bahan Makanan**, Bhratara Karya Aksara, Jakarta
- [33] Pambudi, D. S., 2013, **Pemanfaatan Pasir Laut Teraktivasi H_2SO_4 dan Tersulut Fe_2O_3 Sebagai Adsorben Ion Logam Cu (II) dalam Larutan**, *Skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang, Semarang
- [34] Grassi, M., Chiara, S., Danilo, P., Tommasina, C., Romano, L., dan Gabriele, G., 2009, **Structural Characterization of Calcium Alginate Matrices by Means of Mechanical and Release Tests**, *Molecules*, No.14, 3003-3017
- [35] Ayu, C. S., Anna, R., dan Sutrisno, 2014, **Optimasi Amobilisasi Pektinase dari *Bacillus Subtilis* Menggunakan Ca-Alginat-Kitosan**, *Kimia Student Journal*, Vol. 1, No. 2, 194-200
- [36] Pubchem, 2010, Calcium Alginate, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/44630049#section=2D-Structure>, diakses 7 November 2017
- [37] Simonescu, C. M., 2012, **Application of FTIR Spectroscopy in Environmental Studies**, InTech
- [38] Lestari, P. B., dan Triasih, W. H., 2017, **Mikrobiologi Berbasis Inquiry**, Gunung Samudera, Malang